

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-329679

(P2003-329679A)

(43)公開日 平成15年11月19日 (2003.11.19)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
G 0 1 N 33/53  
C 1 2 M 1/00  
C 1 2 N 15/09  
G 0 1 N 37/00

識別記号  
1 0 2

F I  
C 0 1 N 33/53  
C 1 2 M 1/00  
C 0 1 N 37/00  
C 1 2 N 15/00

データベース(参考)  
M 4 B 0 2 4  
A 4 B 0 2 9  
1 0 2  
F

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願2002-133818(P2002-133818)

(22)出願日 平成14年5月9日(2002.5.9)

(71)出願人 591108178

秋田県

秋田県秋田市山正4丁目1番1号

(72)発明者 岩渕 明

岩手県盛岡市北松園2丁目17-3

(72)発明者 赤上 陽一

秋田県秋田市御所野元町5-11-9

(72)発明者 梅原 徳次

愛知県名古屋市北区名城2丁目2-8-16

(74)代理人 100082669

弁理士 福田 寛三 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNAチップ用基板、DNAチップ、及びそれらの製造方法、並びに解析システム

(57)【要約】

【課題】 メディカルサイエンス、バイオサイエンスの分野での研究促進を図ることができるDNAチップ用基板、DNAチップ、及びそれらの製造方法、並びに解析システムを提案する。

【解決手段】 本発明のDNAチップは、基板上に、凹部底面から隆起する複数の山状スポット部を設け、該山状スポット部の頂部平面のみが親水性で且つnmスケールの凹凸を備え、その他の部分は疎水性である基板の頂部平面上に既知のDNAを定着させてなる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板上に、凹部底面から隆起する複数の山状スポット部を設け、該山状スポット部の頂部平面のみが親水性で且つnmスケールの凹凸を備え、その他の部分は疎水性であることを特徴とするDNAチップ用基板。

【請求項2】 請求項1の基板の頂部平面上に既知のDNAを定着させてなることを特徴とするDNAチップ。

【請求項3】 先端が球形状を有する微細工具を電極とし、他方の電極を被加工物下部に配置し、微細工具の先端と被加工物とを接近した非接触状に配置した間に、溶媒の主成分が20°Cにて1~1,000cStの粘度を有するシリコーンオイルで、この溶媒に粒子径が0.1~30μmの電気的誘電性を持つ砥粒を分散させた液状組成物を配設し、電界強度±0.3~5kV/mm、周波数0.1~100Hzの交流電界を印加しながら砥粒が配向した状態で微細工具を高速回転させて加工する微細加工方法により金属金型を作成し、該金属金型を用いて請求項1の基板を作成することを特徴とするDNAチップ用基板の製造方法。

【請求項4】 請求項3にて得られた基板上に過剰量のDNAを滴下して頂部平面にDNAを定着させることを特徴とするDNAチップの製造方法。

【請求項5】 請求項2に記載のDNAチップを用いた解析システムであって、未知のDNAを滴下した後、低周波交流高電圧を与えるようにしたことを特徴とする解析システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、メディカルサイエンス、バイオサイエンスの分野での研究促進を図ることができるDNAチップ用基板、DNAチップ、及びそれらの製造方法、並びに解析システムに関する。

【0002】

【従来の技術】従来、DNAチップを用いた解析システムは、培養された構造が既知のDNAが多数ポイント定着されたDNAチップを用い、該DNAチップ上に、未知のDNAを滴下して既知のDNAと反応(ハイブリダイゼーション)させてDNA同士が結合したものと、結合しないものを洗浄して選別し、その反応の具合を発色させる等させて読み取る方法である。尚、DNAチップは、培養された構造が既知のDNAを、スポットと呼ばれる塗布装置を用いて平面状のガラスやシリコンの基板上に、1,000~10,000ポイントも塗布されて高密度にDNA分子を定着させたものであり、市販されている。また、反応(ハイブリダイゼーション)は、DNAチップ上のDNA分子と試料中のDNAとが結合するか否かを調べることで、試料中に目的のDNAが存在するかを調べることができ、例えば病気等によりDNAの一部が損傷しているとDNA間の相補性が損なわれ

ることを検知することができる。そして、このような解析システムは、メディカルサイエンス、バイオサイエンスと広範に適用されるものである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、前記従来の解析システムには、以下の①~⑤に示すような課題があった。

①既知のDNAを定着させたDNAチップは、極めて高価であり、また解析装置も高価であるため、研究の進展を抑制するものであった。

②未知のDNAを、多数の既知のDNAの定着ポイントに、正確に且つ均一に塗布することは極めて困難であり、その精度とバラツキによって解析データの品質低下を招くものであった。

③DNAチップは、基体が平面ガラスであり、極めて接近して隣接するポイントと混じらないように反応(ハイブリダイゼーション)させるには高度なテクニックが必要であった。そして、反応させる環境を均一にすることは困難であり、得られる反応にバラツキが生じ易かった。

④DNAチップに定着させた既知のDNAは、定着ポイント数は多いが、1ポイント当たりの定着量が少ないため、解析感度が低かった。

⑤反応時間が16~24時間と長いため、臨床への適用が困難であった。これらの課題を解決し、DNAチップの早期臨床現場への適用が実現するための研究を進展させる必要がある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は上記を鑑み提案されたもので、臨床現場において採用可能な高い信頼性を有し、検出能力が高く、解析システムにおける取り扱い及び処理が容易であり、迅速且つ高感度な解析システムを実施することができるDNAチップの開発を目的とし、基板上に、凹部底面から隆起する複数の山状スポット部を設け、該山状スポット部の頂部平面のみが親水性で且つnmスケールの凹凸を備え、その他の部分は疎水性であるDNAチップ用基板、及び該基板の頂部平面上に既知のDNAを定着させたDNAチップに関するものである。

【0005】また、本発明は、前記DNAチップ用基板及びDNAチップの製造方法をも提案するものであり、基板の製造方法は、先端が球形状を有する微細工具を電極とし、他方の電極を被加工物下部に配置し、微細工具の先端と被加工物とを接近した非接触状に配置した間に、溶媒の主成分が20°Cにて1~1,000cStの粘度を有するシリコーンオイルで、この溶媒に粒子径が0.1~30μmの電気的誘電性を持つ砥粒を分散させた液状組成物を配設し、電界強度±0.3~5kV/mm、周波数0.1~100Hzの交流電界を印加しながら砥粒が配向した状態で微細工具を高速回転させて加工する微細加

工方法により金属金型を作成し、該金属金型を用いて前記DNAチップ用基板を作成する。また、得られた基板上に過剰量のDNAを滴下して頂部平面にDNAを定着させてDNAチップを作成する。

【0006】さらに本発明は、前記DNAを用いた解析システムをも提案するものであり、未知のDNAを滴下した後、低周波交流高電圧を与える。

【0007】

【発明の実施の形態】前述のように従来のDNAチップは、平板状の基板上における既知のDNAの定着ポイント数が1,000～10,000ポイントもの多数であるため、未知のDNA（試料）を滴下する作業が困難であったり、解析感度が低いため反応後の解析・読み取りに高価な共焦点レーザを用いた顕微鏡による解析装置が必要であった。また、極めて接近して隣接するポイントと混じらないように反応（ハイブリダイゼーション）させるには高度なテクニックが必要で、反応させる環境を均一にすることは困難であり、得られる反応にバラツキが生じ易かった。そこで、本発明におけるDNAチップでは解析症例を限定して既知のDNAの滴下ポイント数を数十～数百、例えば100ポイント程度とする。また、凹部底面から隆起する複数の山状スポット部を設け、該山状スポット部の頂部平面のみが親水性で且つnmスケールの凹凸を備え、その他の部分（溝部分）は疎水性とした構成の基板の頂部平面上に既知のDNAを定着させた。

【0008】前記構成の本発明のDNAチップは、図1に示すような表面形状を有し、山状スポット部（断面略台形状）の頂部平面ではDNAがより多く定着し、過剰量のDNAを滴下すると頂部平面に広がり、余剰量は排水効果で溝部分へと流れ落ちる。尚、未知のDNA（試料）を滴下する際にもポイントが混じり合うことはあり得ず、正確に且つ均一に塗布することができ、高度なテクニックも必要なく、再現性に富む反応を実施することができる。そのため、従来のDNAチップに比べて10倍以上もの大幅に感度が向上し、高価な共焦点レーザを用いた顕微鏡による解析装置も必要としない。このように本発明のDNAチップは、前述の課題の～④を解決できるものであって、反応検出能力が従来に比べて極めて高いものとなる。

【0009】本発明のDNAチップ（DNAチップ用基板）における凹部深さや山状スポット部のピッチ間隔、頂部平面の寸法及び形状等については特に限定するものではない。例えば図1では頂部平面は正方形としたが、例えば頂部平面は円形状としても良く、その他どのような形状でも良い。また、1枚あたりの定着ポイント数を100ポイント程度とするため、ピッチ間隔や頂部平面の寸法は自ずと数十～数百μm程度となり、凹部深さは数十μm程度となる。また、このDNAチップ（DNAチップ用基板）の基板素材としては、ガラスや硬質

プラスチックなどを用いることができる。

【0010】上述のような形状特性を有するDNAチップ（DNAチップ用基板）は、前述のような微細加工方法により容易に作成することができる。

【0011】微細加工方法に用いる液状組成物は、以下の溶媒と砥粒からなる。溶媒は、20°Cにおいて1～1,000cStの粘度を有するシリコーンオイルを主成分として用いる。砥粒は、粒子径が0.1～30μmの電気的誘電性を持つ絶縁性粒子、半導体粒子、金属粒子であり、加工幅（1～50μm）に応じてそれ以下の粒子径のものを用いる。この砥粒の電気的誘電性については、砥粒の比誘電率が前記溶媒の比誘電率より1以上大きいものが望ましい。それにより砥粒は液状組成物中に与えられた電界勾配によって砥粒に力が発現（誘発）される。そして、前記溶媒中に、前記砥粒を混合して超音波分散機などにて均一に分散させて液状組成物とする。印加する交流電界は、電界強度±0.3～5kV/mm、周波数0.1～100Hz、波形は立ち上がりが30～500V/μsecの繰り返しでプラス、マイナスに振れる方形波や正弦波である。印加周波数が0.1Hz未満では砥粒が沈降する可能性があり、100Hzを超えると砥粒が周波数に対して応答できず動けなくなる。用いる微細工具は、その先端が回転電極として用いられるものであって、特に材質を限定するものではないが、例えばタンゲステン合金系やcBN材などの超硬材や導電性を有する脆性材、プラスチックさらに砥粒を保持しながら加工を進める銅合金さらに焼入れ鋼などを用いることができる。また、この微細工具の先端は、球形状を有するようにならべて成形している。また、この微細工具を回転電極として用いるのであるが、具体的には例えばエアースピンドルなどの設備機構を付帯させ、その際の回転速度を5,000～100,000rpm程度とすることが望ましい。上記微細工具が兼ねる回転電極に対する他方の電極は、被加工物の下部に配置するが、この電極をX-Y軸テーブルとし、それに対して垂直方向をZ軸として微細工具の移動を制御するようにしても良い。また、このX-Y軸テーブルは、固定電極としても良いし、回転可能な電極としても良い。

【0012】このような材料及び設備を用いて本発明の微細加工方法を実施するには、微細工具と被加工物とを、接近した非接触状に配置するのであるが、具体的にその距離（Z軸方向の距離）は加工幅（1～50μm）に応じて調整すれば良く、その調整には例えば拡大鏡をCCDカメラ（100～300倍）に取り付けて微細工具の側方から撮影し、モニターに写し出しながら微細工具を一体化的に取り付けたZ軸テーブルの微動調整で設定距離に調整すれば良い。勿論、微細工具と被加工物との間には前記組成の液状組成物が配置される。そして、まず20Hz以上100Hz以下の高い周波数の交流高電圧を印加して液状組成物中の砥粒を共振させ、電極間（上方

の回転電極と下方の電極との間)においてそれらの動きは微振動を呈し、配向状態となり、微細工具の先端に砥粒が保持されて加工準備が整う。ここでさらに微細工具を一体的に取り付けたZ軸テーブルを微動調整して電極間の距離を狭める。次に、微細工具を高速回転させると共に印加周波数を0.1～20Hzに変更すると、液状組成物中の砥粒は電極間にて活発に運動する。すなわち回転電極である微細工具の先端は砥粒を保持しながら微細加工することができるものである。この微細加工において、微細工具の回転によって発生する遠心力にて砥粒が飛散する力も与えられるが、電界により砥粒は飛散せずに加工により生じた加工屑のみを遠心力にて電界の外へ弾き出すことができる。また、この微細加工において、微細工具の先端は常に被加工物と非接触状態を維持し、加工は砥粒によってなされるので、工具を被加工物に接触させて加工する場合のように摩擦による発熱を生ずることがないし、より精微な加工を実施することができる。

【0013】このような微細加工方法により金属金型を作成し、該金属金型を用いて前記DNAチップ用基板を作成することにより、前述の課題①を解決できる。山状スポット部の頂部平面を親水性化するには、ポリアミド系樹脂等の親水性膜を形成する樹脂などをコーティングすれば良いし、溝部分を疎水性化するには、ポリエチレン系樹脂等の疎水性膜を形成する樹脂などをコーティングすれば良い。頂部平面と溝部分とで差が生ずればよいので、少なくとも何れか一方の処理を施すようにすれば良い。望ましくは、基板素材が親水性のガラスである場合には溝部分を疎水化処理すれば良く、基板素材が疎水性の硬質プラスチックである場合には頂部平面を親水化処理すれば良い。尚、上述の親水化処理及び疎水化処理については樹脂膜の形成に限定するものではなく、公知のどのような処理を施すようにしても良い。また、頂部平面にnmスケールの凹凸を形成するには、ナノフォーミングにより微細な凹みを与えることによって既知のDNAの補足定着性を向上することができる。

【0014】作成したDNAチップに未知のDNA(試料)を滴下して反応(ハイブリダイゼーション)させるに際し、従来のDNAチップを用いた解析システムでは前述のように16～24時間もの時間を要していたが、本発明では、低周波交流高電圧を与えることにより既知のDNA及び未知のDNAを攪拌させることができ、反応時間を1時間以内(1/20)に大幅に短縮することができ、前述の課題⑤を解決できる。尚、前述のように、本発明におけるDNAチップでは解析症例を限定したが、それ以外の基本的な解析システムについては同様であり、未知のDNAを含む試料を滴下して既知のDNAとの反応(ハイブリダイゼーション)させ、未反応となるものを水などにて洗浄することにより、未知のDNAの一部が壊れていることを検出するものである。図2

に本発明のDNAチップの製造及びそれを用いた解析システムの概略についてのフローチャートを示した。

【0015】以下に、前述の頂部平面を親水性化するためにポリアミド系樹脂の親水化膜を形成する手法について説明する。DNAは吸水性のあるナイロン6(R)やナイロン66(R)に強く定着することが知られている。そのため、山状スポット部の頂部平面上に、ナイロン(R)微小スポット(0.1mm半径の円形領域)を製作することにより、そのナイロン(R)スポットに選択的にDNAを定着させることができるのである。ナイロン(R)微小スポットを作成するには、磁場あるいは電場をナイロン(R)微小粒子に印加して定着させれば良い。具体的には、磁性流体中にナイロン(R)粒子を分散させ、磁場をかけた場合に、作用するナイロン(R)粒子上に発現する極同士の反発力をを利用するか、あるいは電場中においては分極したナイロン(R)球同士の反発力をを利用する。そのような反発力がマイクロ粒子に作用することで、粒子が平面上に均一に分布し、その粒子の分布を光学顕微鏡で観察した後、基板を200°C程度に加熱することにより、ナイロン(R)微小球が溶融して定着し、頂部平面上にナイロン(R)微小スポットが製作される。

【0016】既に本発明のDNAチップ(DNAチップ用基板)を製造するのに好適な微細加工方法について説明したが、それ以外の製造方法の例を説明する。前述のように本発明のDNAチップ(DNAチップ用基板)は、基板上に、凹部底面から隆起する複数の山状スポット部を設けた形状構成であるから、山状スポット部の頂部平面の周囲の溝部分を掘削して成形することができる。例えば油圧や死荷重及びバネ荷重で接触圧力を制御する方式では困難であるが、磁場などの場により流体中の微小粒子に自在に場により力を与え、また場により微小粒子の分布をコントロールする事でガラスのような脆性材料であっても容易に研削、研磨することができる。例えば既に1994年に登録された特許第1835310号や特許第1835317号、米国特許第4821466号などにより、磁性流体と磁場で柔軟に加工圧力を印可することで、割れやすい材料を従来法の40倍から100倍の高能率で研磨仕上げすることができる。さらに、磁性流体中の砥粒の分布と砥粒の長手方向の向きが磁場によりコントロールできることを応用して3次元非球面ガラスレンズの局所領域の微小研磨法、米国特許第5076026号もある。

【0017】DNAチップ用基板の山状スポット部の頂部平面にnmスケールの凹凸を形成するためのナノフォーミングについては、走査イオン顕微鏡を用いてタングステンカーバイド材等の圧子材に径1.0～10.0nmの針状形状を形成させ、該圧子材を用いて孔を規則的に設けることが可能である。

【0018】

【実施例】[DNAチップ用基板の作成(その1)] D

DNAチップ用基板を製作するための金型を、以下のような手順にて微細加工を行って作製した。微細工具としては、タングステンカーバイド系超硬材（超硬WC）を用い、先端形状はポールエンドミルとし、その径はR0.2（直径0.4mm）とした。ここで加工面とポールエンドミルとは30度の角度を持たせ、切りこみ量を100nmづつ追いこみながらさらにX軸テーブルを微動させた。ここで被削材と工具との非接触は、CCDカメラとレーザー変位計を共用して確認を取るようにした。さらに加工面の表面粗さを改善するために、工具を先端が球状の超硬材工具（径：R0.15）に付け換えて、加工面との距離を0.005mmとし、試料である超硬材の下部にはX-Yテーブルを配置して下方の固定電極とした。液状組成物としては平均粒径1μm以下のダイヤモンド砥粒をシリコーンオイル濃度20wt%に調整し分散させた流体を用いた。溶媒には粘度が50から100cStのシリコーンオイルを用いた。印加電界として上部の微細工具と下部の固定電極に波形が繰り返し方形波で周波数1Hz、電圧は±1.5kV/mmとする交流高電圧を印加して精密Z軸テーブルの微動送りで微細工具と試料間を0.001mmづつ狭めつつX軸テーブルを微動送りしながら微細工具を20,000rpm（5000～100,000rpm）で回転させた。加工後の評価は倒立顕微鏡で実施した。本加工により得られた金型は、凹部底面から隆起する複数の山状スポット部を設けた形状の基板を製作するための金型として微細な凹凸形状を有するものとなった。この金型を用いて、基板寸法が5×5mm、厚み70μmであって、凹部深さ50μm、山状スポット部のピッチ260μm、頂部平面200×200μmの山状スポット部が10×10個形成されたDNAチップ用基板を作製した。

【0019】〔DNAチップ用基板の作成（その2）〕ガラスに直径5μmの微小ディンプルを30μm間に製作し、縦横0.3mmの中に100個の微小ディンプルアレイを製作する手法先端が鋭利な単結晶ダイヤモンド工具を20,000回転で回転させ、金型表面に対して1μm以下のディンプルを与えた。NC制御により、前記ダイヤモンド工具を30μm間隔で上下左右の100ポイントに移動させ、100個のディンプルアレイを製作した。前記ダイヤモンド工具の接触位置決めは、CCDカメラで目視により設定した。尚、加工時には水を供給し、加工力を低下させ、前記ダイヤモンド工具の長寿命化を図った。続いて前記微細加工方法を用い、各ディンプルの中央に円盤状の平坦部（頂部平面を形成する）を作製して金型とした。この金型を用いて、縦横0.3mmの中に100個の略円錐状の山状スポット部が形成されたDNAチップ用基板を作製した。

【0020】〔親水化、疎水化処理〕前記作成（その1）により得られたDNAチップ用基板に対し、山状スポット部の頂部平面にはナイロン(R)微小スポットを形

成した。

【0021】〔ナノフォーミング〕走査イオン顕微鏡を用い、ビーム径50nmでイオン銃にはGa液体金属を用いて加速電圧を20kVにて超硬材WC（ナノフォーミングの圧子材）に格子状にイオンビームを当てて50nmの角柱を形成した。作製された圧子材を用い、親水化、疎水化処理したDNAチップ用基板の頂部平面に50nm程度の孔を形成した。

【0022】〔DNAチップの作製；DNAチップ用基板への既知のDNAの定着〕現行の平坦状スライドガラス基板を用いたDNAチップの製造業者に依頼し、同様に既知のDNA液を前記本件DNAチップ用基板の頂部平面に滴下し、DNAを前記50nm程度の孔に定着させて固定化した。超微細な孔を設けることで相乗的にDNAの定着性並びに固定化が促進され、ハイブリダイゼーション時の短縮並びに解析感度が向上したことが実験終了後、報告された。

【0023】〔解析システム〕現行の平坦状スライドガラス基板を用いたDNAチップを使用している医療研究業者に依頼し、同様に被検出DNAを前記本件DNAチップに塗布した後、DNAチップを上下に電極で挟み込み、交流電界強度1.5kV/mm、周波数1Hzを印加して搅拌した。搅拌により反応が現行のスライドガラスを用いたDNAチップを使用した場合に比べて約100倍程度促進し、數十分程度で反応が終了したことが報告された。イネをサンプルに用いて評価し、既存のcy3、やcy5をつかった蛍光を用いて検出するシステムにおいて、測定面積の直径が50μmから200μmであるとおよそ15倍の面積となり、低倍の顕微鏡でも容易に観察可能となり、装置コストが低減できること、解析スピードが上がったことが報告された。

【0024】

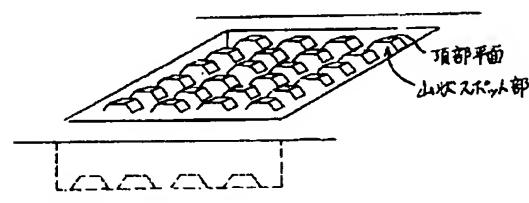
【発明の効果】以上説明したように本発明のDNAチップ及びそれを用いた解析システムは、従来のDNAチップが有する数々の課題を全て解消できるものであり、反応検出能力が従来に比べて極めて高いものである。そのため、従来不可能であった臨床現場でのDNAチップを用いる医療への導入が加速する。特に、安価で且つ反応検出能力に優れ、高度なテクニックを必要とすることなく再現性に優れた解析データを得ることができるため、メディカルサイエンス、バイオサイエンスの分野で飛躍的な研究促進が図られ、それによる研究成果により、健康な高齢化社会の到来や医療現場に大きな変革がもたらすことが期待される。さらに製薬メーカーでは個人個人の体质を考慮した創薬の研究開発用に採用され、適切な処方によって回復が速くなるとともに拒否反応が抑えられ、不要な薬の投与が回避されることが期待される。また、本発明のDNAチップ用基板、DNAチップの製造方法は、電界によって砥粒の配置を微細工具の先端に制御かつ保持することができる微細加工方法を適用したも

# BEST AVAILABLE COPY

(6) 003-329679 (P2003-329679A)

のであり、工具の回転によって発生する遠心力による砥粒の飛散を電界によって抑え、保持することができ、さらに砥粒の電界極性の切り替わる時に生じる砥粒の運動によってセルフドレッシングや衝撃力加工を促進することができる。

【図1】

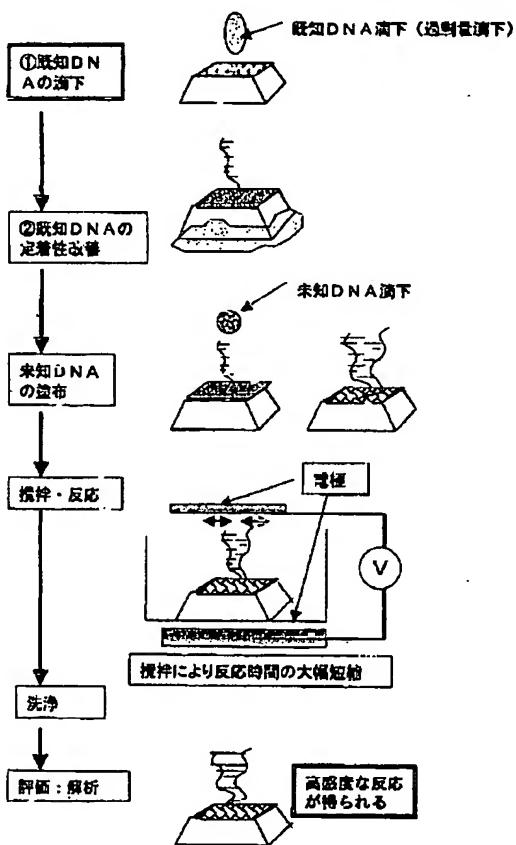


## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のDNAチップの一実施例を示す斜視図である。

【図2】本発明のDNAチップの製造及びそれを用いた解析システムの概略についてのフローチャートである。

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 松村 隆  
神奈川県横浜市港北区高田西1-14-3-  
505

(72)発明者 吉野 雅彦  
東京都大田区北千束1-13-18

(72)発明者 小西 智一  
秋田県秋田市千秋矢留町7-34 県公舎5  
号

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 HA14  
4B029 AA07 CC04 FA15